昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, July 2011, 54(7): 828 – 837　　ISSN 0454-6296

基于线粒体 COⅡ基因序列的双斑长跗萤叶甲中国北方地理种群的遗传多样性研究

梁日霞[1,2]，王振营[2,*]，何康来[2]，丛　斌[1,*]，李　菁[2]
(1. 沈阳农业大学生物科学技术学院，沈阳 110161；
2. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193)

摘要：双斑长跗萤叶甲 *Monolepta hieroglyphica* (Motschulsky)是自 2001 年以来在我国北方为害玉米呈加重趋势的一种害虫。为初步探讨中国北方不同地理种群间和种群内该害虫的遗传分化程度、遗传多样性以及基因流水平，对来自中国北方的 26 个不同地理种群的线粒体 COⅡ(细胞色素 C 氧化酶亚基Ⅱ)基因片段序列的核苷酸多态性进行了研究。结果表明：在 515 头个体的长度为 484 bp COⅡ片段中共发现了 28 个变异位点和 15 种单倍型。单倍型间的系统进化分析发现，15 种单倍型主要分为两大分支。总种群单倍型多样性指数 *Hd* 为 0.257，种群内单倍型多样度在 0.100 ~ 0.515 范围内。总种群的 *Fst* 为 0.585，*Gst* 为 0.417，基因流 *Nm* 为 0.35。AMOVA 分子变异分析结果发现，双斑长跗萤叶甲的遗传分化主要来自种群之间，占方差比率的 58.58%。实验总种群及大部分种群的中性检验符合中性突变，说明我国北方双斑长跗萤叶甲在近期没有出现种群扩张现象。研究结果揭示中国北方双斑长跗萤叶甲不同地理种群间基因流水平低，种群间已发生明显的遗传分化，分化主要来自种群之间。

关键词：双斑长跗萤叶甲；线粒体 COⅡ；地理种群；遗传多样性；遗传分化
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)07-0828-10

Genetic diversity of geographic populations of *Monolepta hieroglyphica* (Motschulsky) (Coleoptera: Chrysomelidae) from North China estimated by mitochondrial COⅡ gene sequences

LIANG Ri-Xia[1,2], WANG Zhen-Ying[2,*], HE Kang-Lai[2], CONG Bin[1,*], LI Jing[2] (1. College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: *Monolepta hieroglyphica* (Motschulsky) (Coleoptera: Chrysomelidae) has become more serious on maize in some maize planting areas of North China since 2001. To investigate the level of genetic diversity, genetic differentiation and gene flow among different populations and within populations of *M. hieroglyphica* in North China, partial sequences (484 bp) of mtDNA COⅡ (mitochondrial cytochrome oxidase subunit Ⅱ) gene in 26 geographic populations from North China were sequenced and analyzed. In the total 515 individuals, 28 variable sites and 15 haplotypes were observed. Phylogenetic tree of 15 COⅡ haplotypes exhibited two main clusters. The mean haplotype diversity of all populations was 0.257, varied from 0.100 to 0.515 within populations. The overall *Fst* value was 0.585, *Gst* was 0.417, and the average gene flow (*Nm*) among the 26 populations was 0.35. Molecular variance (AMOVA) analysis indicated that a high proportion of the total genetic variance was attributable to variations among populations (58.58%). The Tajima's *D* neutrality test results suggest that for *M. hieroglyphica* in North China there might be no population expansion. These results indicate that the level of gene flow among different populations is very low, and there is obvious differentiation among *M. hieroglyphica* populations in North China.

Key words: *Monolepta hieroglyphica*; mtDNA COⅡ; geographic population; genetic diversity; genetic differentiation

---

基金项目：现代农业产业技术体系建设专项(CARS-02)；公益性行业(农业)科研专项(200903004)
作者简介：梁日霞，女，1984 年生，山西省山阴县人，硕士研究生，动物细胞与分子生物学，E-mail：lrxlscx@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wangzy61@163.com; bin1956@163.com
收稿日期 Received: 2011-02-10；接受日期 Accepted: 2011-05-20

双斑长跗萤叶甲 *Monolepta hieroglyphica*（Motschulsky）属鞘翅目（Coleoptera），叶甲科（Chrysomelidae），一年发生 1 代，以卵滞育，在土壤中越冬（冯祥和，1992）。该虫在我国分布广泛，国外则在东亚和东南亚很多国家分布，寄主作物有数十种，同时还取食多种杂草，是多食性害虫（虞佩玉等，1996）。近年来对玉米和棉花等农作物的为害呈加重趋势（石洁等，2005；王立仁等，2006；吕昭智等，2007），为害区域和面积正逐渐扩大，已经成为陕西关中、山西、河北北部、北京北部、内蒙古、吉林、黑龙江和辽宁等省区及部分地区玉米和新疆北疆棉花上的重要害虫。目前国外对其研究报道甚少，国内也仅仅是对双斑长跗萤叶甲的形态学和生物学方面做了些研究。双斑长跗萤叶甲卵期较长，5 月上旬开始孵化，中旬为孵化盛期。孵化后的幼虫生活在土中，以杂草为食，尤喜食禾本科植物的根。幼虫期 30 ~ 40 d，老熟后做土室化蛹，蛹期 7 ~ 10 d（冯祥和，1992）。7 月上旬始见成虫为害玉米，8 月下旬至 9 月上旬进入为害高峰期，玉米收获后迁入蔬菜田和油菜田继续为害。成虫羽化后经取食补充营养后才交尾，卵散产或几粒粘在一起产在表土中，9 月上旬为交尾产卵盛期（王立仁等，2006）。双斑长跗萤叶甲的寄主范围已从原来的禾本科、豆科等向锦葵科的陆地棉扩展（陈静等，2007）；成虫在不同寄主植物间取食存在差异（聂强和孙强，2009）；成虫在 22 ~ 31℃范围能正常生长繁殖，且在 19℃下寿命最长，但此温度不利于该虫的发生和繁殖等（李广伟等，2010）。

目前，对叶甲科昆虫的科学研究正由传统的外部形态学研究转向细胞学、分子生物学等微观领域。细胞学和分子生物学作为一种对形态学和生态学等基础研究的一种补充和佐证，已经得到越来越多的研究者的青睐。

目前利用分子生物学技术进行叶甲科昆虫亲缘关系方面的研究报道甚少（Nokkala and Nokkala，2004）。为了明确该害虫发生危害加重的内在原因，有必要从害虫种群遗传分化及系统发育方面做深入探讨。随着分子生物学技术的广泛应用，分子标记技术已成为昆虫分子系统学研究中的一个新热点（李正西和沈佐锐，2002）。分子系统学应用于昆虫研究方面，主要包括核 DNA 和线粒体 DNA（mtDNA），其中 mtDNA 基因应用较广泛。mtDNA 是闭合的环状双链 DNA，具有严格遵守母系遗传方式、进化速度比核基因快和基因组成高度保守等特点，因此在动物分子系统学研究领域具有一定的优势（陈复生等，2003），mtDNA 现已被广泛用于昆虫系统发育、种群遗传变异及分化，以及近缘种的鉴别等方面的研究，由于 COⅡ基因长度在 670 ~ 690 bp 之间，在 mtDNA 中相对其他基因位置比较保守（卜云和郑哲民，2005）。因此，我们利用线粒体 COⅡ（细胞色素 C 氧化酶亚基Ⅱ）基因作为分子标记，对中国北方部分地区的双斑长跗萤叶甲种群进行分子水平上的研究，从个体及种群的基因遗传分化程度和基因交流水平来探讨该害虫危害日益严重的内在遗传因素，以期为对其进行合理有效的控制提供科学的理论依据，并为今后在该领域进行深入研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

本试验中所用的双斑长跗萤叶甲种群，分别于 2009 年 7 月 - 2010 年 9 月采自我国 26 个不同地点的玉米田或大豆田等。采集虫态均为成虫。种群样本量、采集地点和寄主等详情如表 1 所示。采回后单头甲虫置于离心管，-80℃保存至 DNA 提取。

1.2　基因组 DNA 的提取

用 1 × TE（Tris-EDTA，pH 8.0）缓冲液于冰浴中研磨单头双斑长跗萤叶甲，使用组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒（博迈德公司）提取 DNA（具体提取过程按照试剂盒说明书步骤进行操作）。提取完成后取 3 μL DNA 于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测提取质量，检测合格后 -20℃保存备用（李菁等，2010）。

1.3　PCR 扩增及产物测序

1.3.1　引物设计：首先根据已登录的叶甲总科及叶甲科若干昆虫线粒体 COⅡ基因的部分序列（GenBank 登录号：DQ451678）设计特异性上游引物 F：5′-GAGCATCTCCTTTAATAGAACA-3′；简并性下游引物 R：5′-ATTCTTTCWAHDACAATWGGTATAA-3′；然后根据测得的部分种群序列设计特异性下游引物 A：5′-GTATAAATGAGTGATTGGCTCC-3′，以及测序引物 C：5′-TGCTATAATAATTTTAGTAAT-3′。

1.3.2　PCR 扩增体系及反应条件：PCR 反应总体系为 25 μL，其中包含模板 DNA 1.0 μL，上/下游引物各 1.0 μL（10 μmol/L），ddH_2O 9.5 μL，2 × Taq PCR MasterMix 12.5 μL。PCR 反应程序：94℃预变性 5 min；35 个循环（94℃变性 45 s，53.5℃退

表 1 双斑长跗萤叶甲种群采集信息及供试样本量

Table 1 Collecting data and number of individuals tested of *Monolepta hieroglyphica* in this study

种群代码 Population code	采集地 Location	寄主 Host plants	地理坐标 Geo-coordinates	采集时间（年/月）Collecting date (year/month)	供试样本量 Number of individuals tested
BL	黑龙江北林 Beilin, Heilongjiang	玉米 Corn	46.75°N, 126.78°E	2009/08	20
ZD	黑龙江肇东 Zhaodong, Heilongjiang	玉米 Corn	46.02°N, 125.90°E	2009/09	19
LJ	黑龙江龙江 Longjiang, Heilongjiang	玉米 Corn	47.10°N, 123.02°E	2010/07	20
NH	黑龙江讷河 Nehe, Heilongjiang	大豆 Soybean	48.48°N, 125.02°E	2009/09	18
NA	吉林农安 Nong'an, Jilin	玉米 Corn	44.20°N, 125.12°E	2009/09	20
JY	吉林靖宇 Jingyu, Jilin	玉米 Corn	42.30°N, 127.05°E	2009/09	20
MHK	吉林梅河口 Meihekou, Jilin	玉米 Corn	42.63°N, 125.83°E	2009/09	20
YS	吉林榆树 Yushu, Jilin	玉米 Corn	44.50°N, 126.02°E	2009/09	18
CY	吉林昌邑 Changyi, Jilin	玉米 Corn	43.95°N, 126.45°E	2009/09	20
YZ	辽宁银州 Yinzhou, Liaoning	玉米 Corn	42.23°N, 123.78°E	2009/09	20
TB	辽宁沈阳铁北新区 Tiebei, Shenyang, Liaoning	玉米 Corn	41.90°N, 123.23°E	2009/09	20
BP	辽宁北票 Beipiao, Liaoning	玉米 Corn	41.38°N, 121.25°E	2009/09	20
WFD	辽宁瓦房店 Wafangdian, Liaoning	玉米 Corn	39.67°N, 121.90°E	2009/09	20
FC	辽宁凤城 Fengcheng, Liaoning	玉米 Corn	40.13°N, 124.37°E	2009/09	20
YJH	内蒙古伊金霍洛 Yijinhuoluo, Inner Mongolia	玉米 Corn	39.52°N, 109.73°E	2009/09	20
DLT	内蒙古达拉特 Dalate, Inner Mongolia	玉米 Corn	40.32°N, 110.45°E	2009/08	20
KEQ	内蒙古科尔沁 Kerqin, Inner Mongolia	玉米 Corn	42.25°N, 119.25°E	2009/08	20
HL	内蒙古和林格尔 Helinger, Inner Mongolia	玉米 Corn	40.30°N, 110.13°E	2009/08	20
YQ	北京延庆 Yanqing, Beijing	玉米 Corn	40.27°N, 115.93°E	2009/07	20
YC	山西榆次 Yuci, Shanxi	玉米 Corn	37.40°N, 12.42°E	2010/07	20
DT	山西大同 Datong, Shanxi	玉米 Corn	39.00°N, 112.25°E	2010/08	20
XF	山西忻府 Xinfu, Shanxi	玉米 Corn	38.10°N, 110.88°E	2010/08	20
SC	山西朔城 Shuocheng, Shanxi	大豆 Soybean	39.08°N, 111.88°E	2010/08	20
QX	河南淇县 Qixian, Henan	玉米 Corn	35.54°N, 114.11°E	2010/07	20
YLC	陕西杨陵 Yangling, Shaanxi	玉米 Corn	34.20°N, 107.65°E	2009/09	20
YLR	陕西杨陵 Yangling, Shaanxi	萝卜 Radish	34.20°N, 107.65°E	2009/09	20

火 30 s，72℃延伸 1 min）；最后 72℃ 10 min。反应结束后每个样品各取 5 μL PCR 产物，于 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。电泳结果在 Dolphin-DOC (Wealtec Corp.)凝胶成像系统下拍照记录，确定成功扩增后将 PCR 产物送交公司进行正向测序。

1.4 COⅡ基因序列整理及分析

用 Chromas 软件读取序列，在 DNAMAN 上进行多序列同源比对处理，并辅以人工读取和校对，将所得序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对、确认。

应用软件 DnaSP5.0 (Librado and Rozas, 2009) 计算种群的变异位点百分比、各种群单倍型数、单倍型多样性 *Hd*、核苷酸多样性指数 *Pi*、核苷酸平均差异数 *K* (Jukes-Cantor)、种群间核苷酸歧异度 *Dxy*、核苷酸平均差异数 *Kxy*、种群间遗传分化程度参数 *Fst* 和 *Gst*、种群间的基因流 *Nm* 等分子遗传学参数，并进行中性检验 (Kimura, 1983; Tajima, 1983, 1989)。

用 MEGA 4.0 软件(Tamura *et al*., 2007)，采用最大简约法 (maximum parsimony, MP)、邻接法 (neighbor joining, NJ)(基于 Kimura's -2-parameter 模型) 和最小进化法 (minimum evolution, ME)，Bootstrap 1 000 次重复检验，构建单倍型系统发生树。选取天牛科黄星天牛 *Psacothea hilaris* COⅡ基因序列作外群。并计算不同单倍型间的遗传距离 (基于 Kimura-2-Parameter 模型)。利用 Arlequin 3.11软件(Excoffier *et al*., 2005)对种群进行分子变异分析(AMOVA)。

2　结果与分析

2.1　COⅡ基因片段的测序与序列分析

分别以 26 个种群的 515 头个体的 DNA 为模板进行线粒体 COⅡ基因片段的 PCR 扩增得到 520 bp 左右的片段产物，经电泳检测确认为目的条带。经多重序列比对后，去掉两端测序误差大的区域，均得到长度为 484 bp 的片段。

分析比较 515 条序列，同源性均在 98% 以上，序列对齐后无碱基缺失或插入现象。在 484 bp 长度的区域内保守位点(conserved sites)有 456 个，变异位点(variable sites)有 28 个，变异百分率为 5.8%，突变总数(total number of mutation)为 29。其中自裔位点(singleton variable sites) 8 个；简约信息位点 20 个。变异位点中转换/颠换率(R)为 3.788。在碱基组成上，COⅡ基因的碱基平均含量为 A 占 34.7%，T 占 41.3%，G 占 11.2%，C 占 12.8%。A + T 占 76.0%，G + C 占 24.0%，表现出明显的 A/T 碱基偏向性。

2.2　单倍型、核苷酸多样度及中性检验分析

所有样本 515 头个体中共检测出 15 种单倍型(Haplotypes)分别命名为 COⅡ-Hap1 – Hap15 (GenBank 登录号：HQ909339 ~ HQ909353)。统计各种群单倍型数(表 2)，其中有 7 个种群具有 3 种单倍型，有 8 个种群由 2 种单倍型组成，有 11 个种群仅由 1 种单倍型组成。在 15 种单倍型中出现频率最高的是 Hap1，占全部个体的 86.02% (443/515)，除辽宁凤城种群(FC)外的其余 25 个种群都具有该种单倍型，且有 9 个种群的全部个体均属于这种单倍型；其次出现频率较高的单倍型为 Hap5，占总个体数的 3.69% (19/515)，且该种单倍型仅现于凤城种群(FC)；单倍型 Hap8 有 15 头个体；Hap14 有 13 头个体且均为延庆种群(YQ)；Hap4 有 10 头个体；Hap2 有 6 头个体，其他单倍型均仅出现 1 次，属于稀有单倍型。在这 15 种单倍型中，没有所有种群都共享的单倍型。

由单倍型之间的遗传距离(表 3)，可知不同单倍型的遗传距离在 0.002 ~ 0.228 之间，平均遗传距离为 0.043。

总种群单倍型多样度(haplotype diversity, *Hd*)为 0.257，核苷酸多样度(nucleotide diversity, *Pi*)为 0.00389，核苷酸平均差异数(average number of nucleotide differences, *K*)为 1.880。不同地理种群的单倍型多样度在 0.1 ~ 0.515 之间，核苷酸多样度在 0.00021 ~ 0.01469 之间，核苷酸平均差异数在 0.1 ~ 7.11053 范围内(表 2)，仅具有 1 种单倍型的种群以上各项参数均为 0(表中未列)。

Tajima's *D* 中性检验结果表明(表 2)，我国北方双斑长跗萤叶甲总体上在较近的历史时期未经历明显的种群扩张，检验结果虽然为负值但不显著($P > 0.10$)。对各个种群而言，除 YC，MHK，FC 和 YQ 4 个种群中性检验结果显著外($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，其他种群均不显著($P > 0.10$)。

2.3　各 COⅡ单倍型之间的系统进化和单倍型距离分析

15 种单倍型与一个外群构建的 MP，NJ 和 NE 系统发生树(图 1 – 3)，3 种构建进化树的方法均表明：双斑长跗萤叶甲 COⅡ基因 15 种单倍型均明显与外围群分开，且分为两大分支。Hap14 和 Hap15 的个体均采自延庆(YQ)，Hap10 仅为 1 头梅河口(MHK)个体。各个分支的聚集状态与各单倍型之间的遗传距离一致(文中未列出数值)。

不同系统发育树的构建有一定的特定条件，因此有一定的适用范围。同时采用多种方法构建系统树，几种方法得到一致的系统进化树,可以大大提高分析结果的可靠性(方雪梅，2009)。从以上 3 种方法构建的进化树并结合不同单倍型之间的遗传距离(表 3)可知，3 种方法没有明显的优劣区分，而且由 3 种聚类树均表明，各单倍型处于平行地位。

2.4　不同地理种群遗传多样性及遗传分化分析

总种群的 *Fst* (Hudson *et al.*, 1992)为 0.585，基因流 *Nm* 为 0.35，*Gst* 为 0.417。各种群间的核苷酸差异数(*Kxy*) 在 0 ~ 0.0252 之间，平均值为 0.0039；核苷酸歧异度(*Dxy*) 在 –0.0002 ~ 0.0169 范围内，平均值为 0.0023；遗传分化系数(*Gst*) 在 –0.0218 ~ 1 之间，其平均值为 0.2857；种群间固定系数(*Fst*)在 – 0.0427 ~ 0.9419，平均值为 0.1653。

通过 AMOVA 分子变异分析结果可以看出(表 4)，本研究中 26 个双斑长跗萤叶甲种群间的方差组分为 0.5629，占方差比率的 58.58%；种群内部的方差组分为 0.3979，占方差比率的 41.42%，且差异极显著($P < 0.0001$)，说明中国北方双斑长跗萤叶甲的遗传分化主要来自种群之间。再次说明部分种群之间已经产生了明显的遗传分化。

表 2 双斑长跗萤叶甲各地理种群 COⅡ的单倍型、核苷酸多样性分析及 Tajima's *D* 中性检验

Table 2 COⅡ haplotype diversity, nucleotide diversity and Tajima's *D* neutrality test in different geographic populations of *Monolepta hieroglyphica*

种群 Population	单倍型数 Number of haplotypes (h)	单倍型多样度 Haplotype (gene) diversity (*Hd*)	核酸苷多样度 Nucleotide diversity (*Pi*)	核苷酸平均差异数 Average number of nucleotide differences (*K*)	Tajima's *D*	中性检验显著性 Statistical significance
BP	3	0.279	0.00099	0.479	-1.158	不显著 Not significant, $P>0.10$
NA	2	0.279	0.00095	0.458	-0.440	不显著 Not significant, $P>0.10$
YC	3	0.195	0.00207	1.000	-2.256	**, $P<0.01$
MHK	3	0.195	0.00368	1.779	-2.251	**, $P<0.01$
WFD	3	0.195	0.00041	0.200	-1.513	不显著 Not significant, $P>0.10$
YJH	3	0.353	0.00520	2.516	-0.376	不显著 Not significant, $P>0.10$
YQ	3	0.511	0.01469	7.111	2.143	*, $P<0.05$
YS	3	0.386	0.00099	0.477	-0.438	不显著 Not significant, $P>0.10$
SZ	2	0.189	0.00352	1.705	-1.127	不显著 Not significant, $P>0.10$
FC	2	0.1	0.00186	0.900	-2.219	**, $P<0.01$
DLT	2	0.1	0.00021	0.100	-1.164	不显著 Not significant, $P>0.10$
LJ	2	0.1	0.00021	0.100	-1.164	不显著 Not significant, $P>0.10$
DT	2	0.337	0.00626	3.032	0.671	不显著 Not significant, $P>0.10$
BL	2	0.189	0.00039	0.189	-0.592	不显著 Not significant, $P>0.10$
ZD	2	0.515	0.00106	0.515	1.472	不显著 Not significant, $P>0.10$
总种群	15	0.257	0.00389	1.880	-1.450	不显著 Not significant, $P>0.10$

** 差异极显著($P<0.01$) Extremely significant difference ($P<0.01$); * 差异显著($P<0.05$) Significant difference ($P<0.05$).

表 3 双斑长跗萤叶甲不同单倍型之间的距离

Table 3 The distance of different haplotypes from *Monolepta hieroglyphica*

	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	Hap8	Hap9	Hap10	Hap11	Hap12	Hap13	Hap14	Hap15
Hap1	-														
Hap2	0.004	-													
Hap3	0.002	0.006	-												
Hap4	0.019	0.019	0.021	-											
Hap5	0.017	0.017	0.019	0.002	-										
Hap6	0.006	0.006	0.008	0.021	0.019	-									
Hap7	0.002	0.006	0.004	0.021	0.019	0.008	-								
Hap8	0.002	0.002	0.004	0.017	0.015	0.004	0.004	-							
Hap9	0.002	0.006	0.004	0.021	0.019	0.008	0.004	0.004	-						
Hap10	0.034	0.03	0.036	0.032	0.03	0.036	0.036	0.032	0.034	-					
Hap11	0.002	0.006	0.004	0.021	0.019	0.008	0.004	0.004	0.004	0.036	-				
Hap12	0.002	0.006	0.004	0.021	0.019	0.008	0.004	0.004	0.004	0.036	0.004	-			
Hap13	0.002	0.006	0.004	0.021	0.019	0.008	0.004	0.004	0.004	0.036	0.004	0.004	-		
Hap14	0.034	0.03	0.036	0.032	0.03	0.036	0.036	0.032	0.034	0.004	0.036	0.036	0.036	-	
Hap15	0.032	0.027	0.034	0.03	0.027	0.034	0.034	0.03	0.032	0.002	0.034	0.034	0.034	0.002	-

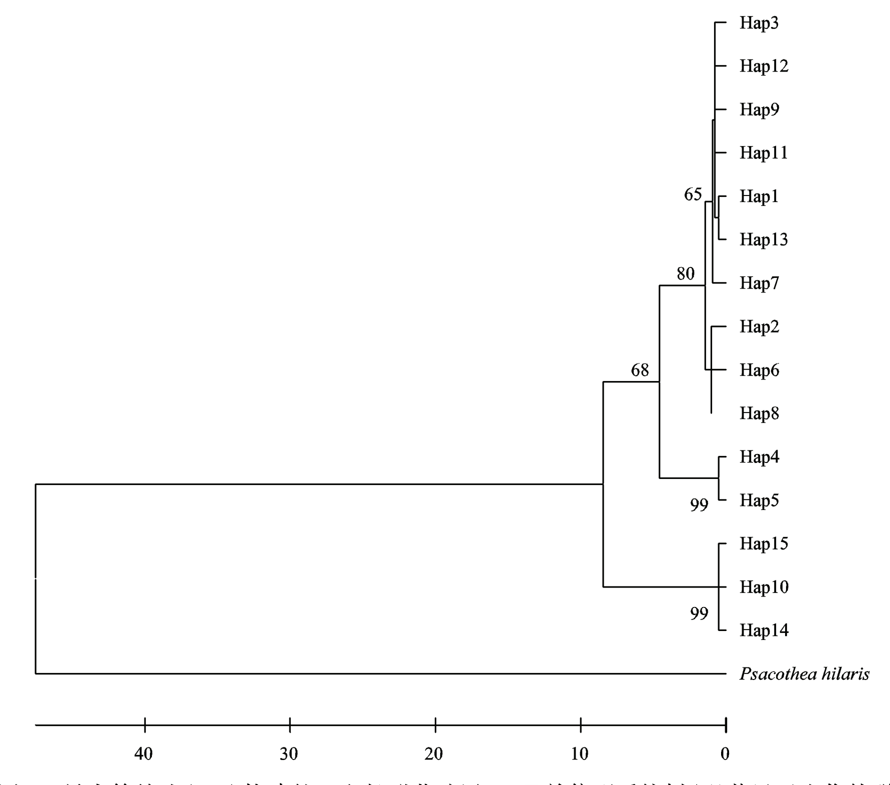


图 1　最大简约法(MP)构建的双斑长跗萤叶甲 COⅡ单倍型系统树(以黄星天牛作外群)

Fig. 1　Maximum parsimony phylogenetic tree of *Monolepta hieroglyphica* COⅡ haplotypes with *Psacothea hilaris* as the outgroup

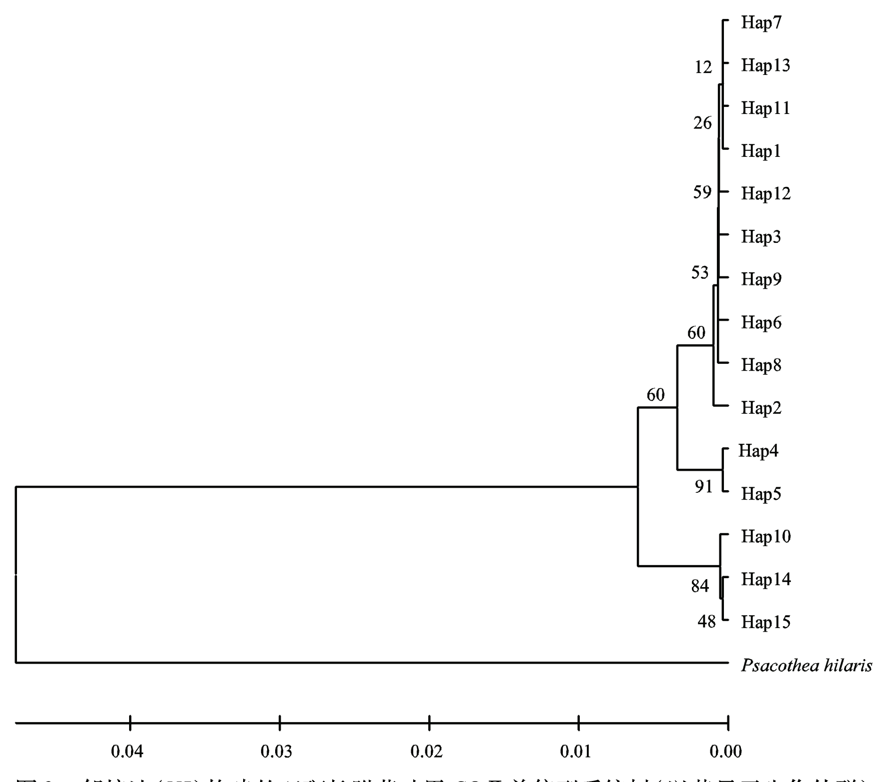


图 2　邻接法(NJ)构建的双斑长跗萤叶甲 COⅡ单倍型系统树(以黄星天牛作外群)

Fig. 2　Neighbor joining phylogenetic tree of *Monolepta hieroglyphica* COⅡ haplotypes with *Psacothea hilaris* as the outgroup

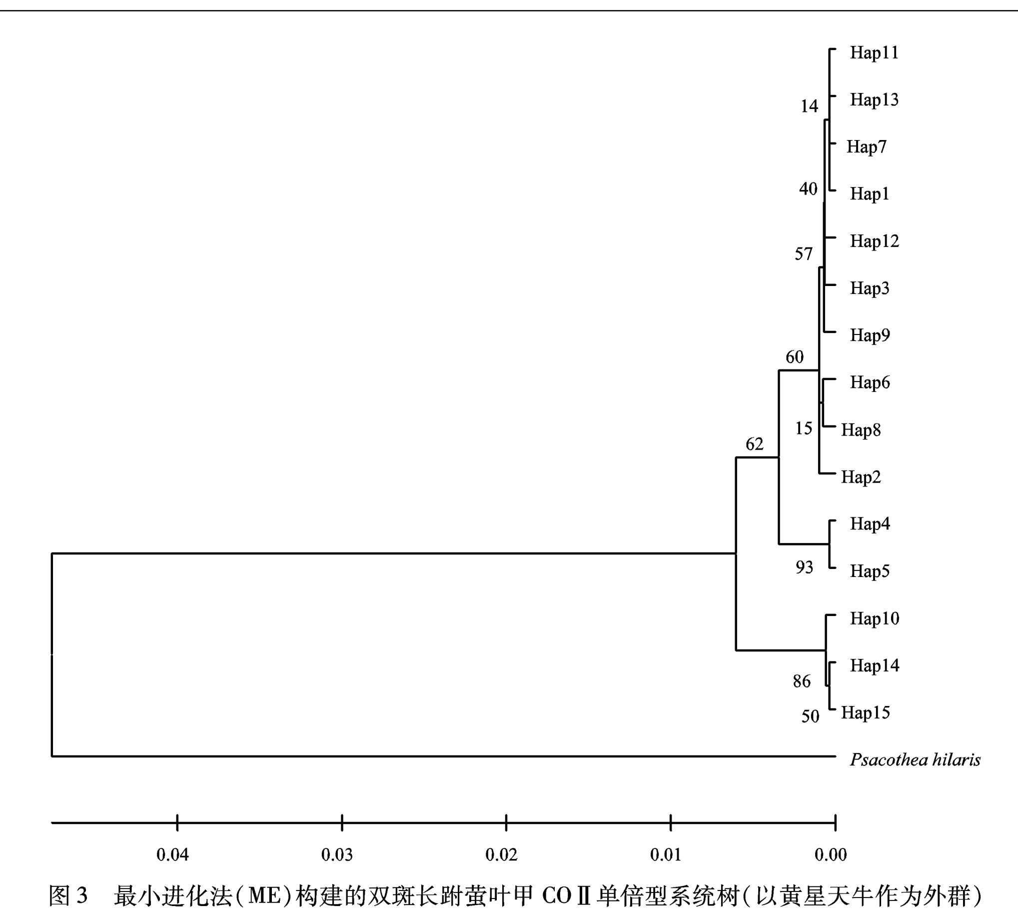


图 3 最小进化法(ME)构建的双斑长跗萤叶甲 COⅡ单倍型系统树(以黄星天牛作为外群)

Fig. 3 Minimum evolution phylogenetic tree of *Monolepta hieroglyphica* COⅡ haplotypes with *Psacothea hilaris* as the outgroup

表 4 双斑长跗萤叶甲 26 个种群线粒体 COⅡ基因的分子变异分析

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) of mitochondrial COⅡ gene in populations of *Monolepta hieroglyphica*

变异来源 Source of variation	自由度 *df*	平方和 Sum of squares	方差组分 Variance components	方差比率(%) Percentage of variation	*P* 值 *P* value
种群间 Among populations	25	288.661	0.5629 Va	58.58	<0.0001
种群内 Within populations	489	194.587	0.3979 Vb	41.42	< 0.0001
总变异 Total	514	483.249	0.9608	100	

3 讨论

本研究基于 mtDNA COⅡ基因片段进行分析，探索了中国北方双斑长跗萤叶甲种群遗传多样性水平以及不同地理种群之间的遗传分化关系。在长度为 484 bp 的 515 条序列中，COⅡ基因片段的 A + T 含量为 76.0%，符合 Jermiin 和 Crozier (1994)的研究结果，他们认为昆虫线粒体 COⅡ基因的 A + T 含量存在明显的进化趋势，即昆虫低等的目到高等的目 A + T 含量有逐渐增加的趋势(杨瑞生等，2008)。

15 种单倍型之间序列相似度均达 98% 以上，各种群的核苷酸差异数(*Kxy*)的平均值为 0.00394；核酸歧异度(*Dxy*)的平均值为 0.00231，说明不同地理种群间在 COⅡ基因水平上虽然相似性很高，但已经出现一定程度的遗传差异，这可能与双斑长跗萤叶甲不同地理种群所处的生态和地理环境有关。

所有种群中存在 1 种单倍型的种群有 11 个，其他 15 个种群均出现 2 种或 2 种以上的单倍型，可见双斑长跗萤叶甲大部分种群具有一定水平的遗传多样性。Hap1 是出现频率最高的优势单倍型(占所有试验个体的 86.02%)，除辽宁省凤城种群(FC)外，其余 25 个地理种群均共享单倍型 Hap1，由此推测该单倍型在系统发生上较为原始，并且能

够在种群中稳定存在。各地理种群的单倍型多样性及单倍型组成种类在地理分布上没有呈现出明显的规律性，东北三省和华北地区均有多种单倍型存在，但地处中原的河南省淇县种群（QX）和西北地区的2个陕西杨陵种群（YLC/YLR）都仅由Hap1一种单倍型组成，从其结果上看，陕西杨陵的2个种群虽然采自不同寄主（玉米/萝卜），并没有表现出任何遗传差异。采自山西中北部3个相邻地区不同寄主的大同种群（DT，玉米），朔城种群（SC，大豆）和忻府种群（XF，玉米）中，XF所有个体，SC中18个和DT中16个个体均属于Hap1，SC剩余的2个和DT剩余的4个均属于Hap4，可见，地理位置较近的区域种群虽然采自不同寄主作物，其单倍型分布是比较单一的，没有明显的遗传分化。采自黑龙江讷河种群（NH，大豆）的18个个体也均属于Hap1。结合以上结果，推测来自不同寄主的种群并没有表现出太大的遗传分化差异，而且几乎都属于原始单倍型。据报道，分布在法国的欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 已分化成“玉米型”和“艾蒿型”2种寄主型，2种寄主型之间已经产生了生殖隔离，发现不同寄主作物上分布的种群间具有明显的遗传分化（Thomas *et al*., 2003；Malausa *et al*., 2007）。寄主分化是否会导致双斑长跗萤叶甲在遗传水平上的明显分化，这个问题的解答还需要将来扩大寄主采集范围，并增加种群数量来进一步研究验证。

通常认为，$Nm > 4$ 表明种群间的基因交流比较充分，若 $Nm < 1$ 则表明种群可能是由于遗传漂变而出现了遗传分化（Allendorf，1983），本研究中总种群的基因流 Nm 为0.35（$Nm < 1$），说明双斑长跗萤叶甲各种群之间基因交流程度很低。分子变异分析结果表明来自种群之间的遗传变异（58.58%）大于来自种群内部个体间的变异（41.42%），此结果也反映出种群间的基因交流不频繁，部分种群间已经产生了明显的遗传分化。至于双斑长跗萤叶甲的成虫扩散在多大程度上会导致不同种群间的基因交流，由于国内外没有双斑长跗萤叶甲成虫扩散等方面的详细研究，尚不能推断。田间观察表明，双斑长跗萤叶甲成虫飞翔能力弱，1次飞行1～5 m（王立仁等，2006），也有1次可飞行10 m以上的报道（冯祥和，1992）。国外在玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte 成虫的扩散研究方面，通过田间观察和风洞试验表明，虽未见玉米根萤叶甲定向远距离飞行，但其成虫善飞，一次可飞24 km，每天可飞近40 km，飞离其羽化地块活动的雌甲虫比雄甲虫多（Toepfer *et al*., 2005）。此外，玉米根萤叶甲成虫可随气流扩散，北美的夏季风暴可将其带到数十公里外，这或许是玉米根萤叶甲横跨美国玉米种植区的原因（Spencer *et al*., 2009）。双斑长跗萤叶甲成虫的飞翔能力虽然弱，但寿命长，常在不同寄主植物间转移（冯祥和，1992），同时，也不能排除其能随气流扩散的可能，因此，如果这种扩散在适宜的条件下连续发生，经过一定时间后，很有可能使得相邻的地理种群之间发生基因交流，但由于不同地理位置特定的环境及生态因素，仍会使不同地理种群出现不同程度的遗传差异。

Tajima’s *D* 检验作为对自然选择的一项中性检验，可以在一定程度上反映出生物种群数量变化动态的历史。检验值为正值，常反映出种群数量的消减、种群分化成亚种群、经历了近期的瓶颈效应，或种群发生大规模迁移；而检验值为负值，通常可能说明在较近的历史时期发生了种群增长，或者较远时期发生了瓶颈效应（Maruyama and Fuerst，1985）。对双斑长跗萤叶甲26个试验种群进行中性检验的结果发现，总种群和大部分种群的 Tajima’s *D* 检验值为负值，且结果不显著，据此推测在我国北方该害虫在较近的历史时期没有出现种群扩张和持续增长模式，种群大小保持相对稳定状态。

萤叶甲亚科的昆虫目前已经上升为一种重要的农林业害虫，由于其食性广、种类多和广泛的分布使其成为探讨研究昆虫起源、与植物协同进化的理想材料，对该类群的研究具有重要的经济和理论意义（吴卫和李冠，2010）。由于目前对叶甲科昆虫的研究还不够深入，萤叶甲亚科各属级之间的亲缘关系一直以来存在争议，因此，通过分子生物学方法来研究该类群的系统发育关系十分重要。

本研究仅限于我国北方采样，除河南淇县种群（QX）和陕西杨陵种群（YLC/YLR）属黄淮海夏玉米区外，其他23个种群均属北方春播玉米区，且仅以线粒体 COⅡ基因为分子标记进行检测。因此若要全面了解我国双斑长跗萤叶甲的遗传多样性以及地理遗传分化程度及分化格局，在今后的研究中，应进一步扩大该害虫地理种群采样范围和样本量，并辅以其他分子标记检测方法，这样才能够为掌握该害虫的发生动态、制定合理的防治策略提供更为全面的种群分子遗传学方面的数据。

参 考 文 献（References）

Allendorf FW, 1983. Isolation, gene flow and genetic differentiation

among populations. In: Schonewald-Cox CM, Chambers SM, MacBryde B, Thomas L eds. Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Animal and Plant Populations. Benjamin Cummings Publishing Company, Menlo Park, California. 51 - 65.

Bu Y, Zheng ZM, 2005. Roles and status of cytochrome oxidase II gene in the research of insect molecular systematics. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(1): 18 - 22. [卜云, 郑哲民, 2005. COII基因在昆虫分子系统学研究中的作用和地位. 昆虫知识, 42(1): 18 - 22]

Chen FS, Fu CY, Wang TC, 2003. Research progress of molecular systematicness of mitochondria gene. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 31(4): 596 - 598, 601. [陈复生, 付承玉, 汪泰初, 2003. 动物线粒体基因分子系统学研究进展. 安徽农业科学, 31(4): 596 - 598, 601]

Chen J, Zhang JP, Zhang JH, Yu FH, Li GW, 2007. Food preference of *Monolepta hieroglyphica*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(3): 357 - 360. [陈静, 张建萍, 张建华, 喻峰华, 李广伟, 2007. 双斑长跗萤叶甲的嗜食性. 昆虫知识, 44(3): 357 - 360]

Excoffier LG, Laval S, Schneider S, 2005. Arlequin ver. 3. 0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47 - 50.

Fang XM, 2009. Phylogenetic analysis of Chrysomelidae in China inferred from mitochondrial COI sequences (Coleoptera: Chrysomeloidea). *Journal of Suzhou University*, 24(1): 113 - 117. [方雪梅, 2009. 利用线粒体 COI 基因序列对中国叶甲科 3 亚科 9 属系统分化的研究. 宿州学院学报, 24(1): 113 - 117]

Feng XH, 1992. Habits and control of *Monolepta hieroglyphica*. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, (4): 31. [冯祥和, 1992. 双斑长跗萤叶甲的生活习性与防治. 山西农业科学, (4): 31]

Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132: 583 - 589.

Jermiin LS, Crozier RH, 1994. The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponeru rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *Journal of Molecular Evolution*, 38: 282 - 294.

Kimura M, 1983. The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, Massachusetts.

Li GW, Chen XL, Zhang JP, Chen J, 2010. Effect of temperature on adult longevity and fecundity of *Monolepta hieroglyphica*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(2): 322 - 325. [李广伟, 陈秀琳, 张建萍, 陈静, 2010. 温度对双斑长跗萤叶甲成虫寿命及繁殖的影响. 昆虫知识, 47(2): 322 - 325]

Li J, Zhang Y, Wang ZY, He KL, Wang Q, 2010. Genetic differentiation and gene flow among different geographical populations of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) in China estimated by mitochondrial CO Ⅱ gene sequences. *Acta Entomologica Sinica*, 53(10): 1135 - 1143. [李菁, 张颖, 王振营, 何康来, 王强, 2010. 基于线粒体 DNA COⅡ 基因的亚洲玉米螟中国不同地理种群遗传分化及基因流研究. 昆虫学报, 53(10): 1135 - 1143]

Li ZX, Shen ZR, 2002. Application of rDNA-ITS2 sequences to the molecular identification of *Trichogramma* spp. *Acta Entomologica Sinica*, 45(5): 559 - 566. [李正西, 沈佐锐, 2002. 赤眼蜂分子鉴定技术研究. 昆虫学报, 45(5): 559 - 566]

Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451 - 1452.

Lv ZZ, Li JB, Wang ZH, Liu GJ, 2007. Preliminary studies on two-spotted leaf beetle, *Monolepta hieroglyphica* on cotton. *Plant Protection*, 29(1): 97 - 99. [吕昭智, 李进步, 王中华, 刘国军, 2007. 棉花新害虫双斑长跗萤叶甲的初步研究. 植物保护, 29(1): 97 - 99]

Malausa T, Leniaud L, Martin JF, Audiot P, Bourguet D, Ponsard S, Lee SF, Harrison RG, Dopman E, 2007. Molecular differentiation at nuclear loci in French host races of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *Genetics*, 176: 2343 - 2355.

Maruyama T, Fuerst PA, 1985. Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics*, 111: 675 - 689.

Nie Q, Sun Q, 2009. Studies on selective feeding of adults of *Monolepta hieroglyphica*. *Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University*, 21(4): 38 - 41. [聂强, 孙强, 2009. 双斑萤叶甲成虫的取食选择性研究. 黑龙江八一农垦大学学报, 21(4): 38 - 41]

Nokkala C, Nokkala S, 2004. Molecular phylogeny and systematics of *Galerucella* and related taxa. In: Jolivet P, Santiago-Blay JA, Schmitt M eds. New Developments in the Biology of Chrysomelidae. SPB Academic Publishing, Hague. 125 - 130.

Shi J, Wang ZY, He KL, 2005. Changes and occurrence trend of corn diseases and insect pests in Huang-Huai-Hai summer corn regions. *Plant Protection*, 31(5): 63 - 65. [石洁, 王振营, 何康来, 2005. 黄淮海地区夏玉米病虫害发生趋势与原因分析. 植物保护, 31(5): 63 - 65]

Spencer JL, Hibbard BE, Moeser J, Onstad DW, 2009. Behaviour and ecology of the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Agricultural and Forest Entomology*, 11: 9 - 27.

Tajima F, 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105: 437 - 460.

Tajima F, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585 - 595.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596 - 1599.

Thomas Y, Bethenod MT, Pelozuelo L, Frerot B, Bourguet D, 2003. Genetic isolation between two sympatric host-plant races of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner. I. Sex pheromone, moth emergence timing, and parasitism. *Evolution*, 57(2): 261 - 273.

Toepfer S, Levay N, Kiss J, 2005. Initial movements of the introduced alien western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) for colonising suitable habitats. In: Alford DV, Backhaus GF eds.

Plant Protection and Plant Health in Europe: Introduction and Spread of Invasive Species, Held at Humboldt University, Berlin, Germany, 9 – 11 June 2005. 173 – 176.

Wang LR, Liu BX, Fu H, 2006. Occurrence and management on *Monoleptera hieroglyphica* in maize. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, (2): 123. [王立仁，刘斌侠，付泓，2006. 玉米田双斑长跗萤叶甲的发生为害情况与防治对策. 陕西农业科学，(2): 123]

Wu W, Li G, 2010. Molecular phylogeny of ten galerucinae species (Coleoptera, Chrysomelidea) and its application to life type evolution in Xinjiang. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 35(3): 523 – 529. [吴卫，李冠，2010. 新疆十种萤叶甲亚科(鞘翅目，叶甲科)昆虫的分子系统发育关系及在生活型进化上的应用. 动物分类学报，35(3): 523 – 529]

Yang RS, Wang ZY, He KL, Bai SX, 2008. Sequence analysis of mtDNA-COⅡ gene and molecular phylogeny of *Ostrinia* spp. from China (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Ecologica Sinica*, 51(2): 182 – 189. [杨瑞生，王振营，何康来，白树雄，2008. 秆野螟属部分种的线粒体 COⅡ基因序列分析及其分子系统学. 昆虫学报，51(2): 182 – 189]

Yu PY, Wang SY, Yang XK, 1996. Economic Insect Fauna of China. Fasc. 54. Coleoptera: Chrysomeloidea (Ⅱ). Science Press, Beijing. 82 – 169. [虞佩玉，王书永，杨星科，1996. 中国经济昆虫志第五十四册：鞘翅目：叶甲总科(二). 北京：科学出版社. 82 – 169]

（责任编辑：袁德成）